

氏 名	上枝 麻友
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4524号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化 —歯髄細胞分化に与える腫瘍壊死因子(TNF- α)の影響—
学位論文審査委員	教授 吉山 昌宏 教授 窪木 拓男 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【緒言】

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を持っており、歯の損傷時には歯髄保護のために象牙芽細胞の活性化や、前駆細胞や歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化により象牙質の修復が生じることが推測されている。

炎症性サイトカインに分類される腫瘍壊死因子(TNF- α)は、炎症時に様々な細胞から産生され組織破壊に深く関与していることが知られている。一方、近年の研究によると、創傷治癒過程では損傷局所において初期の段階で発現し、様々な成長因子、サイトカインの誘導、それに引き続く細胞遊走によって組織再生に関与する可能性も示唆されるようになった。事実、TNF- α は齲蝕に罹患した歯髄組織においても初期に発現が確認されている。

しかし、象牙質・歯髄複合体の損傷に端を発する炎症再生連関において、TNF- α が歯髄細胞にどのような影響を及ぼしているのかは未だ明らかにはなっていない。そこで本研究では、TNF- α が歯髄細胞に与える作用を検討することとした。

【材料および方法】

1. ヒト歯髄細胞の分離・培養：ヒト歯髄細胞はインフォームド Consent の上、研究に同意が得られた患者の抜去第三大臼歯から Gronthos らの手法に準じて単離した。なお、本研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認のもと(承認番号：418)行われた。
2. TNF- α がヒト歯髄細胞の生細胞数に与える影響：TNF- α が歯髄細胞の細胞増殖に与える影響について MTS 法で検討した。
3. TNF- α 前処理実験：歯髄の炎症環境を *in vitro* において模するためにサブコンフルエントとなったヒト歯髄細胞に TNF- α を 10 ng/ml の濃度で添加し 3 日間培養した後、TNF- α を完全に取り除くために継代培養を行い TNF- α 前処理群とした。
4. TNF- α 前処理による歯髄細胞の幹細胞化の検討：TNF- α で前処理した歯髄細胞が幹細胞としての性質を獲得するかどうかについて、細胞表面抗原の変化を細胞免疫染色、FACS (fluorescence activated cell sorter) で、遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で、コロニー形成能を CFU-F アッセイで、そしてテロメラーゼ活性を PCR でそれぞれ検討した。
5. TNF- α 前処理を行った歯髄細胞における多分化能の検討：TNF- α で前処理した歯髄細胞の多分化能を各種(脂肪、軟骨および骨)分化誘導培地で培養後に、各細胞の分化マーカー遺伝子の発現ならびに染色にて検討した。

【結果と考察】

1. **TNF- α がヒト歯髄細胞の生細胞数に与える影響**：歯髄細胞に対して、0～160 ng/ml の TNF- α を添加して3日間培養したところ、この範囲内では濃度が上昇しても生細胞数の減少は認められなかった。これらの結果から、低濃度で短期間の TNF- α 刺激は培養ヒト歯髄細胞の細胞活性にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。
2. **TNF- α 前処理による歯髄細胞の幹細胞化の検討**：細胞免疫染色において、TNF- α 前処理群はコントロール群と比較して間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 および SSEA4 陽性細胞数が増加した。FACS 解析においても、TNF- α 前処理群において間葉系幹細胞マーカーの SSEA4 および CD146 の陽性率が上昇した一方で、骨分化誘導した培養ヒト歯髄細胞ではともに陽性率がコントロール群以下にまで低下した。さらに、TNF- α 前処理により *oct4*, *nanog* の遺伝子発現はともにコントロール群と比較すると、それぞれ 1.6 倍、2.1 倍に上昇した。また、コロニー形成能およびテロメラーゼ活性も、それぞれ TNF- α 前処理により上昇した。以上の結果から、TNF- α 刺激により細胞がより未分化な状態に変化した、すなわち分化した細胞が脱分化することにより幹細胞様の性質を新たに獲得したと推測された。
3. **TNF- α 前処理を行った歯髄細胞における多分化能の検討**：TNF- α で前処理した歯髄細胞は各種分化誘導培地で培養することにより、それぞれ脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現が亢進しており、各系統の細胞に分化することが可能であった。また、コントロール群の培養ヒト歯髄細胞と比較すると、TNF- α 前処理した培養ヒト歯髄細胞は比較的短期間で分化誘導することが可能であった。つまり TNF- α で前処理することにより培養ヒト歯髄細胞は分化誘導を受けやすくなることが明らかとなった。

本実験で用いた培養ヒト歯髄細胞は純粋な歯髄幹細胞の集団ではなく、前象牙芽細胞や歯髄線維芽細胞を含む、分化度が異なる、あるいは分化の方向が異なるヘテロな細胞集団であると推測される。これら細胞集団に TNF- α を添加することで、生細胞数には変化がなく、幹細胞様の性質を持つ細胞の比率が増加したことは、TNF- α 刺激によりある種の細胞が脱分化することにより、自己複製能を有する幹細胞様細胞が増加した結果と推測された。すなわち、TNF- α は創傷部位に存在するある種の細胞を未分化な状態、いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化させ、再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っている可能性が示唆された。

【結論】

ヒト歯髄細胞を TNF- α で前処理することにより、生細胞数は変化しないものの、間葉系幹細胞の表面抗原マーカー陽性率が増加し、*oct4* や *nanog* といった幹細胞マーカー遺伝子の発現が上昇した。また、コロニー形成能が亢進され、テロメラーゼ活性が上昇した。さらに、TNF- α 前処理により歯髄細胞は脂肪細胞や軟骨細胞、骨芽細胞への分化が促進された。これらの結果から、TNF- α は培養ヒト歯髄細胞において、間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能がある細胞の比率を上昇させたと考えられた。

学位論文審査結果の要旨

象牙質・歯髄複合体の損傷に端を発する炎症再生連関において、炎症性サイトカインのひとつである TNF- α が歯髄細胞にどのような影響を及ぼしているのかは未だ明らかでない。

そこで本研究では、ヒト培養歯髄細胞に対する TNF- α の作用を、MTS assay, 表面抗原解析 (FACS, 細胞免疫染色), コロニー形成能, テロメラーゼ活性, 多分化能等を指標に評価した。

その結果, 10 ng/ml という低濃度で短期間の TNF- α 刺激は培養ヒト歯髄細胞の増殖にはほとんど影響を及ぼさないが, TNF- α 前処理群は無処理のコントロール群と比較して SSEA4 陽性率が 25.1%から 50.1%へ, CD146 陽性率が 66.7%から 79%へそれぞれ上昇した。また TNF- α 前処理群はコントロール群と比較すると *oct4*, *nanog* の遺伝子発現がそれぞれ 1.6 倍 ($P<0.001$, t-test), 2.1 倍 ($P<0.05$, t-test) に上昇し, さらに, コロニー形成能は 1.9 倍 ($P<0.001$, t-test), テロメラーゼ活性は 1.9 倍 ($P<0.01$, t-test) に上昇した。すなわちヒト培養歯髄細胞においては TNF- α 刺激により分化した細胞が脱分化することにより幹細胞様の性質を新たに獲得する可能性が明らかとなった。これらの結果から, TNF- α は創傷部位に存在するある種の細胞を未分化な状態, いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化させ, 再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っている可能性が示唆された。

本結果は, 炎症環境における TNF- α の新たな機能を明らかにしたものであり, 歯髄組織に限らず様々な組織における炎症と再生の関連を解明する一助になることが考えられる。また, 今後メカニズムの解明により, 歯髄組織内での炎症を人為的にコントロールし, 象牙芽細胞の再活性化および損傷部位への遊走を促すことで象牙質の再生に結びつけることが可能となれば, 抜髄リスクの軽減, 歯の延命につながる事が考えられ, 今後の再生医療における発展性も大きい。

よって, 審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。